

ヒガンバナ科アルカロイド、リコリン及びリコリシジノールによる 炎症性サイトカイン、TNF- α 産生の阻害

油井 聡,* 三上正彰,* 三巻祥浩,* 指田 豊,* 山崎正利*
帝京大学薬学部薬品化学教室,* 東京薬科大学薬学部薬用植物学教室*

Inhibition Effect of Amaryllidaceae Alkaloids, Lycorine and Lycoricidinol on Macrophage TNF- α Production

Satoru YUI,* Masaaki MIKAMI,* Yoshihiro MIMAKI,* Yutaka SASHIDA,* and Masatoshi YAMAZAKI*
Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,*
1091-1 Suarashi, Sagami-ku, Tsukuba-gun, Kanagawa 199-0195, Japan and Laboratory
of Medicinal Plant Science, School of Pharmacy, Tokyo University
of Pharmacy and Life Science,* 1432-1 Hachioji, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

(Received August 7, 2000; Accepted November 30, 2000)

We previously demonstrated that Amaryllidaceae alkaloids, lycorine and lycoricidinol, inhibit induction of apoptosis by calprotectin derived from neutrophils, and that the latter alkaloid showed suppression in rat adjuvant-induced arthritis model. These findings suggest that the alkaloids have a modulating activity against inflammatory reaction. To explore further the mechanism of the suppression for inflammation, we studied the effect of the alkaloids on macrophage tumor necrosis factor (TNF- α) production *in vitro*, since TNF- α is recognized as a pivotal cytokine to regulate inflammation. As a result of this study, lycorine and lycoricidinol inhibited TNF- α production of murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide (ID₅₀ were 0.2 μ g/ml and 0.002 μ g/ml, respectively). The inhibition was also observed in macrophages treated by Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis*. Both lycorine and lycoricidinol reportedly have inhibitory activity for protein biosynthesis. Although the inhibition of TNF- α production by lycoricidinol was mainly due to the inhibition of protein biosynthesis, lycorine showed inhibition against TNF- α production at lower concentrations than the case that they inhibited ³⁵S-Cysteine/³⁵S-Methionine incorporation into macrophages. These facts suggest that the inhibition of TNF- α production is not due to the inhibitory activity against protein translation at least at lower concentrations. From these results, it was concluded that these alkaloids exert inhibitory effects not only on neutrophil apoptosis-inducing protein, calprotectin, but also on macrophage TNF- α production.

Key words—lycorine; lycoricidinol; TNF- α ; macrophage

緒論

炎症反応は、その始まりから終結に至るまで、炎症に関わる細胞群の産生する種々のサイトカインによって制御を受ける。中でも炎症反応の初期にマクロファージによって産生される TNF- α (Tumor necrosis factor) は、炎症性サイトカインの中でもサイトカインネットワークの中心に位置し、炎症を増幅させる働きを持つとされている。¹⁾したがって、人為的に炎症をコントロールしようとする目的において、マクロファージの TNF- α 産生のプロセスは重要な標的であると考えられる。

著者らは、以前、好中球の細胞質に含まれるタンパク質であるカルプロテクチンが腫瘍細胞など種々の細胞のアポトーシスを誘導することを報告した。^{2,3)}すなわち、カルプロテクチンは、アポトーシス誘導作用を通じて炎症細胞の破壊を誘導する因子

と考えられた。そこで、カルプロテクチンのアポトーシス誘導作用を阻害する物質を探索するために、中国で抗炎症的に用いられている生薬熱水抽出物のスクリーニングを行い、ヒガンバナ植物由来のアルカロイドであるリコリンとリコリシジノールが強い阻害作用を示すことを明らかにした。⁴⁾特に後者のリコリシジノールについては、ラットのアジュバント関節炎の系において、アジュバント投与足の腫脹を抑制する活性を認めたことより、炎症モデルにおいても抑制的に作用する可能性が示唆された。⁵⁾

本論文では、これらのヒガンバナ科アルカロイドの抗炎症作用のメカニズムをさらに検討する目的で、カルプロテクチンによるアポトーシス誘導に対する阻害という作用以外に、これらが炎症反応において中心的な役割を果たすサイトカインである

TNF- α のマクロファージによる産生を阻害する可能性について検討した。

実験の部

1. 試料及び試薬

リコリン (lycorine hydrochloride) は Latoxan 社 (Rosans, France) より購入した。リコリジノールは *Sternbergia lutea* の球茎より別に記載した方法によって抽出、精製した。⁹⁾ Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli*, 0127: B8) は, Difco Laboratory (Detroit, MI, USA) より購入した。Fetal calf serum (FCS) は Summit 社 (Ft. Collins, CO, USA) より購入した。培地は、ペニシリン (100 U/ml) とカナマイシン (60 μ g/ml) を含む RPMI1640 培地 (白水製薬, 東京) を使用した。

2. 方法

2-1. マクロファージの培養 C3H/He マウス (雄, 7週齢以上) は、日本エスエルシー社 (静岡) より購入した。マウスの腹腔に、可溶性デンプン (30 mg) を投与し、4日後に腹腔細胞を採取した。これらの細胞は、熱非働化 FCS を 5% 含む RPMI1640 培地に浮遊させ、96穴プレート (旭テクノグラス, 東京) に 1.2×10^5 個/ウェルになるように添加した。37°C, CO₂ インキュベーターにおいて 1.5 時間静置後、ダルベッコ phosphate-buffered saline (PBS(-)) で 3 回洗浄し、非付着細胞を除去した。残った付着マクロファージに試験サンプルを加え、5% FCS-RPMI1640 培地中で 3 時間 (標準的な場合) 培養後、刺激剤として LPS (1 μ g/ml) を添加し、さらに 2 時間培養し、直後に培地中の TNF- α 濃度を測定した。

2-2. TNF- α の測定 TNF- α 濃度の測定は、特に断らない限り、L-929 細胞に対する細胞傷害性試験¹⁰⁾で測定した。各試料の阻害率 (%) は次の式によって求めた。

Inhibition (%) =

$$\left[1 - \frac{\text{試料と LPS 添加ウェルの TNF 濃度} - \text{無添加対照ウェルの TNF 濃度}}{\text{LPS のみ添加ウェルの TNF 濃度} - \text{無添加対照ウェルの TNF 濃度}} \right] \times 100$$

一部の試験においては、TNF 濃度を Endogen Inc. (Woburn, MA, USA) のマウス TNF- α に特異的な enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットによって測定した。

2-3. LPS 含量の測定 試料中の LPS 含量は、生化学工業 (東京) のトキシカラーシステムを用いて測定した。

2-4. マクロファージのタンパク質合成能の測定 マクロファージに Amersham 社の Pro-mixTM *in vitro* cell labeling mix (³⁵S-Cysteine/³⁵S-Methionine 含有; ³⁵S-Cys/Met と略) を 0.93 MBq/ml になるように添加し、37°C の CO₂ インキュベーターでインキ

ュベートした。その後、培地を除去し、100 μ l の 0.5% Sodium lauryl sulfate を加えてマクロファージを溶解させ、100 μ l の 10% TCA を加えた後、酸不溶性物質をセルハーベスター (フタバメディカル社, 東京) を用いてガラスフィルターに回収した。酸不溶性成分に取り込まれたアイソトープの放射活性は、液体シンチレーションカウンターによってカウントした。

結果と考察

1. LPS によって誘導されるマクロファージ TNF- α 産生に対するリコリン、リコリジノールの影響 リコリン、及びリコリジノール共存下でマクロファージを 3 時間培養することによって、LPS によって誘導されるマクロファージの TNF- α 産生がどのように変化するかを調べた。Fig. 1 に示したように、リコリンは 0.2 μ g/ml の濃度から TNF- α 産生を抑制し、1 μ g/ml ではほとんど TNF- α の放出が認められなくなった。一方、リコリジノールは、1.6 ng/ml という低濃度で抑制を示すことが分かった。両者の ID₅₀ は、約 0.2 μ g/ml と約 0.002 μ g/ml であり、リコリジノールの比活性はリコリンよりも約 100 倍高いことが分かった。なお、

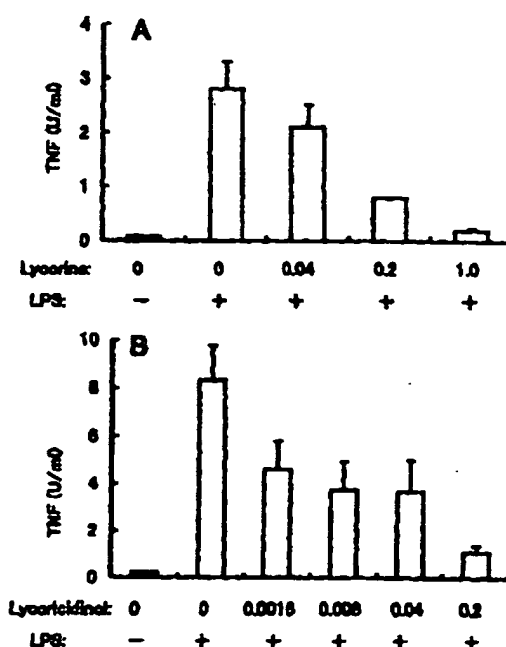


Fig. 1. Effects of Lycorine or Lycoricidinol on TNF Production of LPS-stimulated Macrophages

Starch-induced macrophages were cultured without or with the indicated concentrations of (A) lycorine or (B) lycoricidinol for 3 hrs. After that, the plates were added with 1 μ g/ml LPS and were cultured for additional 2 hrs. TNF concentrations in the supernatants were immediately measured by bioassay. Bars represent the higher and lower values of duplicate estimations.

0.2 $\mu\text{g/ml}$ のリコリシジノールはマクロファージに対して毒性を示すことが観察された。

LPSによって誘導されるTNF- α 産生は、低濃度のLPSの前処理によって抑制されることが知られている²⁾したがって、試料のTNF- α 産生に対する抑制活性を評価する場合には、試料中のLPSの混在に注意する必要がある。リコリン試料中に混在するLPSの含量は、抑制活性を示す1 $\mu\text{g/ml}$ においてわずか1.6 $\mu\text{g/ml}$ と測定された。一方、リコリシジノール試料にはLPSが検出されなかった。したがって、これらのアルカロイドの示すTNF- α 産生抑制効果は、混在するLPSのせいではないと考えられた。

2. リコリン、リコリシジノールのマクロファージTNF- α 産生に対する阻害作用と、それらのタンパク質合成に対する阻害活性との関係 リコリンとリコリシジノールなど、数種のヒガンバナ科アルカロイドには、細胞のタンパク質の生合成を阻害する活性があることが報告されている¹⁰⁻¹¹⁾これらのマクロファージのTNF- α 産生に対する阻害作用が、それらのもつ翻訳系の阻害作用によるものか否かを確かめるために、上記と同様に試料を添加し、LPSを加えて2時間のマクロファージの酸不溶成分への³⁵S-Cys/Metの取り込みを調べた。Fig. 2に示したように、リコリンは0.04–1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で若干取り込みを減少させたが、0.04及び0.2 $\mu\text{g/ml}$ では、TNF- α 産生に対する阻害に比べ、³⁵S-Cys/Metの取り込みに対する阻害は明らかに少なかった。一方、リコリシジノールは、1.6 $\mu\text{g/ml}$ では³⁵S-Cys/Metの取り込みに対する阻害は非常に弱かったが、前述したようにその濃度でもTNF- α 産生は半分近く阻害した。ただし、8 $\mu\text{g/ml}$ では両者ともほぼ同様に阻害された。これらの結果より、リコリンについてはタンパク質合成阻害を示す濃度よりも低い濃度でマクロファージTNF産生を阻害することが示された。一方、リコリシジノールについては、そのTNF産生阻害は、主にタンパク質合成阻害作用による可能性が考えられた。

3. リコリン及びリコリシジノールのマクロファージTNF- α 産生の阻害様式の検討 次にこれらのアルカロイドのTNF- α 産生の阻害様式を調べるために、両者の添加のタイムコースについて検討した (Fig. 3)。リコリンはLPS添加の3時間前に添加した場合及びLPSとの同時添加でTNF- α 産生阻害を示したが、LPS添加の0.5時間後に添加した場合には全く阻害を示さなかった。それに対して、リコリシジノールはLPSとの同時添加では全く阻害活性を示さなかった。したがって、両者の阻害様式はここでもメカニズムが異なる可能性があると考えられた。

これらのマクロファージのTNF- α 産生能に対する阻害作用が不可逆的か否かを調べるために、マク

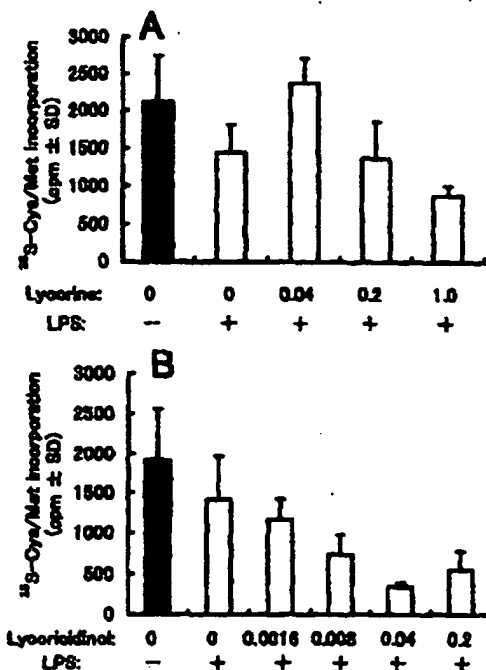


Fig. 2. Effects of Lycorine or Lycoricidinol on Protein Synthesis of LPS-stimulated Macrophages

Search-induced macrophages were cultured without or with the indicated concentrations of (A) lycorine or (B) lycoricidinol for 3 hrs. After that, the plates were added with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, and ³⁵S-Cys/Met was added into the cultures immediately after the LPS addition. After 2 hrs of the additional incubation, the incorporation of ³⁵S-Cys/Met into acid-insoluble fraction of macrophages was measured. Bars represent the higher and lower values of duplicate estimations.

ロファージをリコリン及びリコリシジノールで2時間処理した後に、培地を交換してこれらを除去したうえで、どのくらいの時間インキュベートすればLPSで誘導されるTNF- α 産生能が回復するかを調べた。Table 1に示したように、リコリンあるいはリコリシジノールで3時間処理した時点から0時間とし、即座にLPSを加えた場合には、どちらについてもTNF- α 産生は阻害されたが、アルカロイド処理後、試料を除去し、3時間以上インキュベートしたマクロファージに対するTNF- α 産生阻害はリコリンの場合もリコリシジノールの場合も、ほとんど認められなかった。したがって、これらのアルカロイドは、マクロファージのTNF- α 産生能に不可逆的なダメージを与えている訳ではないと考えられた。

これまでの実験では、TNF- α 濃度の測定にバイオアッセイを用いていたが、次に、産生を阻害しているタンパク質が確かにTNF- α であるという証拠を得るために、TNF- α に特異的なELISAを用いて培地中のTNF- α 濃度を測定した。Table 2に示したように、リコリン、リコリシジノールのどちらもマ

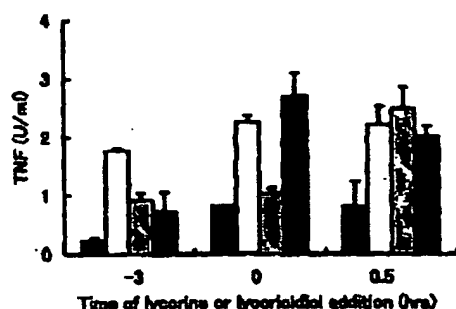


Fig. 3. Time Course Analysis of the Inhibition of TNF Production in LPS-Stimulated Macrophages by Lycorine or Lycoricidinol

Starch-induced macrophages were stimulated with 1 µg/ml LPS for 2 hrs and the time of LPS addition was defined as 0 hr. Prior to, simultaneously with, or after the LPS addition, the macrophages were added without or with lycorine or lycoricidinol at the indicated times, without medium change. The culture supernatants were harvested 2 hrs after the LPS addition, and TNF concentrations were immediately measured by bioassay. ■: medium alone, □: LPS alone, ▨: lycorine (1 µg/ml) plus LPS treatment, ▩: lycoricidinol (0.008 µg/ml) plus LPS treatment. Bars represent the higher and lower values of duplicate estimations.

クロファージ TNF-α 産生を阻害することが、ELISA によっても確かめられた。さらに、LPS とは異なる刺激剤を用いた場合にも阻害効果を示すか否かを検討するために、刺激剤としてグラム陽性細菌である *Enterococcus faecalis* 死菌を用いた。その結果、この系においてもどちらのアルカロイドも TNF-α 産生阻害作用を示すことが分かった。

今回、ヒガンバナ科アルカロイドであるリコリンとリコリシジノールに、マクロファージ TNF-α 産生に対する阻害活性があることが分かった。両アルカロイドには、共にタンパク質合成を阻害する作用があり、リコリシジノールはリコリンよりも低濃度で働くことが報告されている。リコリシジノールについては、TNF 産生を抑制する濃度とタンパク質合成を阻害する濃度とが近接しており、TNF 産生抑制作用は主にタンパク質合成阻害作用によると考えられた。しかし、リコリンについてはマクロファージ TNF-α 産生阻害作用を示す濃度は、タンパク質合成阻害を示す濃度よりも低濃度であることから、少なくとも低濃度においては、TNF-α 産生阻害は直接的なタンパク質合成阻害によらない機序によるとと思われる。今後、転写レベルでの阻害の有無などの検討が必要である。

リコリンとリコリシジノールの阻害作用は、刺激剤としての LPS と同時添加する場合よりも、LPS 添加の 3 時間前に加えたほうが有効であったが、一方、これらのアルカロイドを除去した後に 3 時間以上放置すると、その阻害効果は消失した。このことからこれらがマクロファージに対して不可逆的なダメージを与えた結果、TNF-α 産生を低下させた訳ではないことが示唆された。

Table 1. Effect of the Delayed Addition on the Inhibitory Activity of Lycorine or Lycoricidinol against Macrophage TNF-α Production

Time of LPS addition (hrs)	% Inhibition of TNF-α release*	
	Lycorine pretreatment	Lycoricidinol pretreatment
0	98.4 ± 1.6**	78.6 ± 0.3
3	40.0 ± 9.8	7.0 ± 9.8
6	3.3 ± 0	26.2 ± 31.6

Starch-induced macrophages were pretreated without or with lycorine (1 µg/ml) or lycoricidinol (0.008 µg/ml) during -3 hr-0 hr. The plates were washed with PBS(-) for three times and incubated with standard medium. LPS (1 µg/ml) was added with the indicated times and each plate was re-incubated for 2 hrs. TNF concentrations in the supernatants were immediately measured by bioassay. Assay was performed in duplicate. * % inhibition was calculated as described in Materials and Methods. ** Mean ± difference between mean and upper or lower value.

Table 2. The Effects of the Inhibitory Activity of Lycorine and Lycoricidinol on TNF-α Production from LPS- or *Enterococcus faecalis*-Stimulated Macrophages (Evaluated with ELISA)

Inhibitor	TNF-α production (pg/ml) stimulated with		
	None	LPS	<i>E. faecalis</i>
None	0 ± 10*	212 ± 34	403 ± 5
Lycorine	ND**	28 ± 13	49 ± 10
Lycoricidinol	ND	98 ± 21	124 ± 28

Starch-induced macrophages were cultured without or with the indicated concentrations of lycorine (1 µg/ml) or lycoricidinol (0.008 µg/ml) for 3 hrs. Then, the plates were added without or with 1 µg/ml LPS or 1 µg/ml *E. faecalis* and were cultured for additional 2 hrs. TNF concentrations in the supernatants were measured with TNF-α-specific ELISA. Assay was performed in duplicate. * Mean ± difference between mean and upper or lower value. ** ND, not done.

我々は、リコリンとリコリシジノールが好中球由来のカルプロテクチンのアポトーシス誘導作用を抑えることを報告した⁴⁾したがって、これらは炎症時の組織破壊を防ぐ物質の候補になるのではないかと考察してきた。今後、他のサイトカイン産生に対する影響や、*in vivo*における効果などさらに調べる必要があると思われるが、これらのヒガンバナ科アルカロイドがマクロファージの TNF-α 産生の抑制という、アポトーシス誘導作用とは別の機序の抗炎症作用を示す可能性が考えられた。

REFERENCES

- Vassali P., *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 411-452 (1992).
- Yui S., Mikami M., Yamazaki M., *J. Leuk. Biol.*, 58, 307-316 (1995).
- Yui S., Mikami M., Yamazaki M., *J. Leuk. Biol.*, 61, 50-57 (1997).
- Yui S., Mikami M., Kitahara M., Yamazaki

- M., *Immunopharmacology*, 40, 151-162 (1998).
- 5) Mikami M., Kitahara M., Kitano M., Aiki Y., Mimaki Y., Sashida Y., Yamazaki M., Yui S., *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 674-678 (1999).
- 6) Yui S., Yamazaki M., *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 1028-1034 (1991).
- 7) Zuckerman S. H., Evans G. F., Snyder Y. M., Roeder W. D., *J. Immunol.*, 143, 1223-1227 (1989).
- 8) Takasuka N., Tokunaga T., Akagawa K., *J. Immunol.*, 146, 3824-3830 (1991).
- 9) Jimenez A., Santos A., Alonzo G., Vanquez D., *Biochem. Biophys. Acta*, 425, 342-348 (1976).
- 10) Kukhanova M., Victorova L., Krayevski A., *FEBS Lett.*, 160, 129-133 (1983).
- 11) Virjzen R., Vanden Berghe D. A., Vlietinck A. J., Boeye A., *J. Biol. Chem.*, 261, 505-507 (1986).